

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

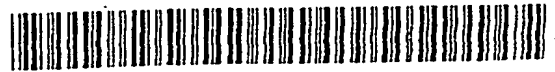
Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

cited in the European Search
Report of EP 95 92 3729.8
Your Ref.: PF 178 EP-LIC



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 43 21 944 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 07 K 16/02
C 07 H 21/04
C 12 Q 1/68
C 12 N 5/18
G 01 N 33/50
// C12N 15/11, C12Q
1/28

②1 Aktenzeichen: P 43 21 944.6
②2 Anmeldetag: 2. 7. 93
④3 Offenlegungstag: 2. 3. 95

DE 43 21 944 A 1

⑦1 Anmelder:
Boehringer Ingelheim International GmbH, 55218
Ingelheim, DE

⑦2 Erfinder:
Ponta, Helmut, Prof. Dr., 76351
Linkenheim-Hochstetten, DE; Heider, Karl-Heinz,
Dipl.-Biol., 76337 Waldbronn, Albtal, DE; Herrlich,
Peter, Prof. Dr., 76229 Karlsruhe, DE; Pals, Steven T.,
Dr., Amsterdam, BE

⑤4 Verfahren zur Diagnose und Analyse von Kolonkarzinomen

⑤7 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Diagnose außerhalb des menschlichen Körpers und/oder Analyse von Kolonkarzinomen. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß es auf dem Nachweis und/oder der Quantifizierung der Expression varianter CD44-Moleküle beruht, insbesondere solcher CD44-Varianten, die das Exon v6 exprimieren. Das Verfahren kann zweckmäßig unter Verwendung von Antikörpern an Proben, beispielsweise Gewebsschnitten von Biopsiematerial, durchgeführt werden, insbesondere mit Antikörpern gegen ein durch Exon v6 kodiertes Epitop. Das Verfahren hat diagnostischen und prognostischen Wert. Es ermöglicht die Abschätzung des Tumorstadiums anhand eines molekularen Markers und gibt damit Anhaltspunkte für die Gesamtüberlebenszeit und das Metastasierungsrisiko.

DE 43 21 944 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Analyse und/oder Diagnose Tumoren, insbesondere von Kolonkarzinomen, Mittel für solche Verfahren sowie deren Verwendung.

Es wurde kürzlich gezeigt, daß die Expression von Varianten des Oberflächen-Glykoproteins CD44 notwendig und hinreichend ist, um sogenanntes spontanes metastatisches Verhalten sowohl in einer nicht-metastasierenden Pankreas-Adenokarzinom-Zelllinie der Ratte als auch in einer nicht-metastasierenden Fibrosarkom-Zelllinie der Ratte auszulösen (Günthert et al., 1991). Während die kleinste CD44-Isoform, die Standardform CD44s, in einer Reihe verschiedener Gewebe, darunter Epithelzellen, ubiquitär exprimiert wird, werden bestimmte Spleißvarianten von CD44 (CD44v) nur auf einer Untergruppe von Epithelzellen exprimiert. Die CD44-Varianten werden durch alternatives Spleißen so erzeugt, daß die Sequenzen von 10 Exons (v1—v10) in CD44s komplett ausgeschnitten werden, jedoch in den größeren Varianten in verschiedenen Kombinationen vorkommen können (Screaton et al., 1992; Tölg et al., 1993; Hofmann et al., 1991). Die Varianten unterscheiden sich dadurch, daß an einer bestimmten Stelle des extrazellulären Teils des Proteins unterschiedliche Aminosäuresequenzen inseriert sind. Solche Varianten konnten in verschiedenen menschlichen Tumorzellen und in menschlichem Tumorgewebe nachgewiesen werden. So wurde kürzlich die Expression von CD44-Varianten im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese untersucht (Heider et al., 1993). Die Expression von CD44-Varianten fehlt in normalem menschlichem Kolonepithel und nur eine schwache Expression ist in den proliferierenden Zellen der Krypten nachweisbar. In späteren Stadien der Tumorphase, z. B. in Adenokarzinomen, exprimieren alle malignen Entartungen Varianten von CD44.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung von neuen Verfahren zur Diagnose und Analyse von Kolonkarzinomen sowie die Bereitstellung von Mitteln für solche Verfahren.

Diese Aufgabe konnte mit der vorliegenden Erfindung gelöst werden. Sie betrifft ein Verfahren zur Diagnose und/oder Analyse von Tumoren, insbesondere Kolonkarzinomen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß variantes CD44 als molekularer Marker verwendet wird. Der Nachweis varianten CD44-Moleküle kann auf Proteinebene mittels Antikörpern oder auf Nukleinsäureebene mittels Nukleinsäuresonden erfolgen. Die Erfindung betrifft demzufolge auch Antikörper und Nukleinsäuren, die als Sonden für solche Verfahren geeignet sind, die Verwendung solcher Antikörper und Nukleinsäuren zur Diagnose und Analyse von Tumoren, insbesondere von Kolonkarzinomen, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung. Bevorzugt sind Verfahren der Untersuchung der Expression von Molekülen, die das Exon v6 enthalten bzw. von Molekülen, die Aminosäuresequenzen enthalten, die durch das Exon v6 kodiert werden. Entsprechend betrifft die Erfindung bevorzugt auch Nukleinsäuren, die mit dem Exon v6 hybridisieren können, Antikörper gegen Epitope, die von Exon v6 kodiert werden und die Verwendung solcher Nukleinsäuren und Antikörper. Besonders bevorzugt sind Verfahren zur Untersuchung des Tumorstadiums eines Kolonkarzinoms, bei dem die v6-Expression untersucht wird.

Die Nuklein- und Aminosäuresequenz des varianten Teils des CD44-Gens ist bekannt (Hofmann et al., 1991, Tölg et al., 1993, Screaton et al., 1992). Die Existenz degenerierter oder alleler Varianten ist für die Ausführung der Erfindung nicht von Bedeutung; solche Varianten sind daher ausdrücklich mit eingeschlossen. Die Sequenz von Exon v6

```

      Q   A   T   P   S   S   T   T   E   E   T   A   T   Q
TC CAG GCA ACT CCT AGT AGT ACA ACG GAA GAA ACA GCT ACC CAG

      K   E   Q   W   F   G   N   R   W   H   E   G   Y   R   Q
AAG GAA CAG TGG TTT GGC AAC AGA TGG CAT GAG GGA TAT CGC CAA

      T   P   R   E   D   S   H   S   T   T   G   T   A
ACA CCC AGA GAA GAC TCC CAT TCG ACA ACA GGG ACA GCT G

```

(einschließlich des Gegenstranges der dargestellten Nukleotidsequenz) ist besonders bevorzugt. Als Mittel, um die Erfindung auszuführen, können Antikörper dienen, insbesondere solche, die gegen Epitope innerhalb der Aminosäuresequenz von Exon v6, besonders bevorzugt innerhalb der Sequenz

TTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPRED

gerichtet sind. Besonders bevorzugt sind monoklonale Antikörper. Für das erfindungsgemäße Verfahren können jedoch auch andere Antikörpermoleküle verwendet werden, z. B. Fab- oder F(ab')₂-Fragmente von Immunglobulinen, rekombinant hergestellte single-chain-Antikörper (scFv), chimäre bzw. humanisierte Antikörper sowie andere Moleküle, die spezifisch an Epitope binden, die durch Exon v6 kodiert werden. Die Herstellung von Antikörpern gegen bekannte Aminosäuresequenzen kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen (Catty, 1989). Beispielsweise kann ein Peptid dieser Sequenz synthetisch hergestellt und als Antigen in einem Immunisierungsprotokoll eingesetzt werden. Ein anderer Weg ist die Herstellung eines Fusionsproteins, das die gewünschte Aminosäuresequenz enthält, indem eine Nukleinsäure (die synthetisch oder z. B. durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus einer geeigneten Probe hergestellt werden kann), die für diese Sequenz kodiert, in einen Expressionsvektor integriert und das Fusionsprotein in einem Wirtsorganismus exprimiert wird. Das gegebenenfalls gereinigte Fusionsprotein kann dann als Antigen in einem Immunisierungsprotokoll eingesetzt und

Insert-spezifische Antikörper oder, im Falle monoklonaler Antikörper, Hybridome, die insert spezifische Antikörper exprimieren, mit geeigneten Verfahren selektiert werden. Solche Verfahren sind Stand der Technik. Heider et al. (1993) und Koopman et al. (1993) beschreiben die Herstellung von Antikörpern gegen variante Epitope von CD44. Ebenfalls als Mittel zur Ausführung können Nukleinsäuren dienen, die mit varianten Exons, insbesondere v6, hybridisieren, insbesondere solche mit einer Homologie von mehr als 80% zur entsprechenden Exonsequenz. Die Herstellung solcher Nukleinsäuren kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen.

Die Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Analyse von Tumoren, insbesondere von Kolonkarzinomen, kann zweckmäßig durch Untersuchungen von aus dem Körper entnommenen Proben, beispielsweise aus Biopsien, erfolgen. Vorteilhaft können dabei die erfindungsgemäßen Mittel verwendet werden. Beispielsweise können Gewebsschnitte immunhistochemisch mit den erfindungsgemäßen Antikörpern mit an sich bekannten Methoden untersucht werden. Aus Gewebeproben gewonnene Extrakte können ferner mit anderen immunoologischen Methoden unter Verwendung der besagten Antikörper untersucht werden, beispielsweise in Western Blots, Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA), Radioimmunoassays (RIA) oder verwandten Immunoassays. Der Nachweis der Expression varianter Exons kann auch auf Nukleinsäureebene erfolgen, beispielsweise durch Hybridisierung von aus Gewebeproben gewonnener RNA (Northern Blot) oder revers transkribierter und PCR-amplifizierter RNA mit geeigneten Proben, oder durch Hybridisierung von Nukleinsäuren in Gewebsschnitten mit geeigneten Proben (in-situ-Hybridisierung). Die Untersuchungen können qualitativ, semiquantitativ oder quantitativ erfolgen. Durch Nachweis und/oder Quantifizierung der Expression varianter CD44-Epitope erhobene Daten können so in die Diagnose und Prognose einfließen. Vorteilhaft kann dabei die Kombination mit anderen prognostischen Parametern sein, etwa mit der Grading.

Die erfindungsgemäßen Verfahren und Mittel eignen sich hervorragend zur Diagnose und/oder Analyse von Tumoren, insbesondere von Kolonkarzinomen.

Die immunhistochemische Untersuchung von Gewebeproben ergab eine differentielle Expression von varianten CD44-Proteinen in normaler kolorektaler Mucosa, adenomatösen Polypen und kolorektalen Karzinomen (Fig. 2). Im normalen Kolonepithel ist die Expression von CD44-Proteinen begrenzt. Nur eine schwache Färbung an der Kryptenbasis zeigte sich in der Anfärbung mit einem monoklonalen Antikörper (mAb NK1-P1) gegen den N-terminalen konstanten Anteil von CD44. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde für die Epitope beobachtet, die durch die Exons v8-v10 kodiert werden.

Expression anderer varianter Exons (v3-v7) war in normalem Kolonepithel nicht nachweisbar (Fig. 2). Wie das normale Kolonepithel, so exprimieren kolorektale Tumoren ebenfalls Spleißvarianten, die die Exons v8-v10 enthalten. Die Expression ist jedoch viel stärker und nicht mehr auf die Krypten begrenzt. Darüber hinaus werden in Tumoren zusätzliche Varianten gefunden, die im normalen Kolonepithel nicht vorhanden sind. Diese Überexpression und zunehmende Vielfalt von CD44-Varianten wird bereits in sehr frühen Stadien der kolorektalen Tumorprogression beobachtet, z. B. in frühen Adenomen, die zusätzlich zu den Exons v8-v10 zum größten Teil CD44-Isoformen exprimieren, die v5 enthalten (Fig. 2). In weiter fortgeschrittenen Stadien der kolorektalen Tumorprogression, z. B. in fortgeschrittenen Polypen und invasiven Karzinomen, nimmt das Ausmaß der Expression von v5-enthaltenden CD44-Varianten zu. Überraschend war jedoch, daß die Tumorprogression stark mit der Expression v6-enthaltender CD44-Isoformen korrelierte (Fig. 2): Expression dieses Exons war nachweisbar in keiner der normalen Kolonproben, in 9% der frühen Polypen, in 45% der fortgeschrittenen Polypen und in 67% der invasiven Karzinome. (Chi-square 1 df p < 0.0001). Darüber hinaus war die Expression von v6 in Karzinomen signifikant korreliert zum Dukes-Stadium. Während der Anteil positiver Proben in den nicht-metastatischen Dukes A und B Tumoren 52% betrug, war er 83% in der metastatischen Dukes C/D-Gruppe (Chi-square 1 df p < 0.05). Zusätzlich konnte beobachtet werden, daß die Überexpression v6-enthaltender CD44-Isoformen während der Tumorprogression nicht nur durch die steigende Zahl positiver Fälle reflektiert wird, sondern auch durch eine zunehmende Zahl positiver Zellen innerhalb eines Tumor sowie durch ein höheres Expressionsniveau (stärkere Anfärbung der Zellen). Die fokale Expression von v6 in Adenomen war mit einem weiteren Parameter der Tumorprogression korreliert, dem histologischen Tumorgrad, wobei in keinem von 17 Adenomen mit niedrigem, jedoch 5 von 6 Adenomen mit hohem Grad v6-Expression positiv war.

Informationen über die v6-Expression, wie sie z. B. durch routinemäßige Immunhistochemie erhalten werden können, können also wegen des überraschenden Zusammenhangs speziell der v6-Expression mit dem Tumorstadium wertvolle Erkenntnisse für Diagnose und Prognose von Kolonkarzinomen ermöglichen.

Abbildungen

Fig. 1: Schematische Darstellung einer CD44-Spleißvariante. Diese beispielhafte Variante trägt alle varianten Exonsequenzen an der einzigen Insertionsstelle. Schwarze oder schraffierte Kästen symbolisieren CD44-Standardsequenzen (CD44s). Das polyklonale Antiserum (anti-CD44v) reagiert mit einem bakteriellen Fusionsprotein, das durch die varianten Exons v3 bis v10 kodiert wird, angezeigt durch den Balken CD44v. Die anderen Balken zeigen die Lokalisierung der Epitope der monoklonalen Antikörper VFF4, VFF7, VFF8, VFF9, VFF11, VFF14 und VFF16 an. Alle monoklonalen Antikörper sind exonspezifisch.

Fig. 2: Expression varianter CD44-Exons in verschiedenen Stadien der kolorektalen Tumorprogression. Ergebnisse aus immunhistochemischen Anfärbungen von Gewebsschnitten (Beispiel 2).

Beispiele

Tumoren und Gewebe

Normale und pathologische Gewebe wurden aus den Beständen der Abteilung für Pathologie, Academic

Medical Center, Universität Amsterdam, Niederlande, entnommen.

Kolorektale Karzinome (n = 39) wurden nach der Klassifikation von Dukes (1937, 1980) in Stadien eingeteilt, in Dukes A (n = 9), Krankheit beschränkt auf die Darmwand; Dukes B (n = 14), Ausdehnung über die Muskelschicht hinaus ohne Metastasierung; Dukes C/D (n = 16), Tumoren mit regionalen bzw. Fernmetastasen. Adenome wurden unterteilt in frühe Adenome (Durchmesser < 1 cm, n = 11) und späte Adenome (Durchmesser > 1 cm, n = 12) und wurden als niedrig oder hoch differenziert nach Standardkriterien graduiert.

Beispiel 1

Herstellung der Antikörper gegen Epitope, die von varianten Exonsequenzen des CD44-Gens kodiert werden

Klonierung von pGEX-Fusionsproteinen

Die gesamte variante Region des HPKII-Typs von CD44v (Hofmann et al., 1991) wurde aus menschlicher Keratinozyten-cDNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die beiden PCR-Primer 5'-CAGGCTGGGAGCCAAATGAAGAAAATG-3', Positionen 25–52, und 5'-TGATAAGGAACGATTGACATTAGAGTTGGA-3', Positionen 1013–984 der LCLC97-varianten Region, wie von Hofmann et al. beschrieben, enthielten eine EcoRI-Erkennungsstelle, die benutzt wurde, um das PCR-Produkt direkt in den Vektor pGEX-2T (Smith et al., 1988) zu klonieren. Das resultierende Konstrukt (pGEX CD44v HPKII, v3–v10) kodiert für ein Fusionsprotein von ~70 kD.

Um Subklone der varianten Regionen zu erhalten, die für Affinitätsreinigungen und Western-Blot-Analysen verwendet werden konnten, wurden Fragmente kloniert, die DI (v3), DII/III (v5, v6), und DIII (v6, v7) enthielten, wobei die passenden Restriktionsschnittstellen verwendet wurden. Fusionsprotein DI enthält die CD44-Sequenz, die von Stamenkovic et al. (1989) beschrieben wurde, von Position 744 bis zur Position 142 der Sequenz von variantem CD44, wie sie von Hofmann et al. (1991) beschrieben wurde. Fusionsprotein DII/III enthält die variante Sequenz von Position 290–460, Fusionsprotein DIII die variante Sequenz von Position 378–638 (Hofmann et al., 1991). Die DI und DIII enthaltenden Fragmente wurden in das pGEX-Vektorsystem, das DII/III-Fragment in den pATH-Vektor (Angel et al., 1988) kloniert.

Polyklonales Antiserum

Die Herstellung und Reinigung des polyklonalen Antiserums gegen die variante Region des CD44-Moleküls ist in der Literatur beschrieben (Heider et al., 1993). Die Exonspezifität des Gesamtserums (anti-CD44v3–v10) ist in Fig. 1 angezeigt (Balken vCD44 polyclonal).

Monoklonale Antikörper

Weibliche BALB/c-Mäuse wurden mit affinitätsgereinigtem Fusionsprotein immunisiert, das aus pGEX CD44v IIPKII (Exons v3–v10) wie oben beschrieben erhalten wurde. Milzzellen eines Tieres mit hohem Antikörpertiter wurde mit P3X63Ag8.653-Myelomzellen unter Verwendung von Polyethylenglykol 4000 fusioniert. Hybridome wurden in HAT-Medium selektiert (Kearney et al., 1979). Bestimmung der Antikörpertiter im Serum sowie das Antikörperscreening wurden mittels ELISA durchgeführt. Die Microtiterplatten wurden mit Fusionsprotein beschichtet, mit seriellen Verdünnungen von Serumproben oder Hybridomaüberständen inkubiert, und spezifische Antikörper wurden mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern gegen Maus-IgG detektiert. Hybridome, die mit Glutathion-Transferase reagierten, wurden eliminiert. Die verbleibenden Antikörper wurden mit ELISA-Tests weiter charakterisiert, wobei Fusionsproteine der variablen Domänen DI (Exon v3), DII/III (Exons v5, v6), DIII (Exons v6, v7), DI-IV (Exons v3–v8), DIII-VI (Exons v7–v10) bzw. v6 (Exon v6) verwendet wurden. Die Reaktivität der Antikörper mit menschlichen Hautkeratinozyten wurde immunhistochemisch untersucht.

Die Exonspezifität der verwendeten Antikörper (NK1-P1, vCD44[polyklonal], VFF4, VFF7, VFF8, VFF9, VFF11, VFF14 und VFF16) ist in Fig. 1 dargestellt.

Beispiel 2

Immunhistochemie

Gefrierschnitte wurden in eisgekühltem Methanol 10 min. fixiert, in PBS (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄, 0,24 g/l KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und mit normalem Ziegen Serum (10% in PBS) präinkubiert. Dann wurden sie 3 × mit PBS gewaschen und für 1 Stunde mit dem Primärantikörper (in PBS, 1% BSA) inkubiert. Endogene Peroxidase wurde mit 0,3% H₂O₂ in Methanol blockiert und die Schnitte mit biotinyliertem Zweitantikörper (entweder anti-Maus oder anti-Kaninchen F(ab')₂, DAKO Corp., Santa Barbara, CA, USA, abhängig vom verwendeten Primärantikörper) inkubiert. Der Immunkomplex wurde mit Meerrettich-Peroxidase visualisiert, die als Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex an Biotin gekoppelt wurde (DAKO). Nach dreißigminütiger Inkubation mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex wurden die Schnitte mit 3,3-Amino-9-ethyl-carbazol (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) für 5 bis 10 min. entwickelt und die Reaktion mit H₂O abgestoppt. Die Zellen wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt, mit Glyzerin-Gelatine eingedeckelt und mikroskopisch untersucht.

Untersucht wurde eine Gesamtzahl von 70 normalen und pathologischen Kolonproben (s. o.) Tumoren wurden als "positiv" bezeichnet, wenn mehr als 10% der Tumorzellen angefärbt waren. Waren weniger als 10%

der Tumorzellen gefärbt, wurde dies als "lokal" bezeichnet.

Literatur

- Angel P., Allegretto, E.A., Okuio, S.T., Hatton, K., Boyle, W.J., Hunter, T., Karin, M. Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* 332: 166 (1988).
- Catty, D. (Hrsg.) Antibodies. IRL Press Oxford, 1989.
- Dukes, C. E. Histological grading of rectal cancer. *Proc. R. Soc. Med.*, 30: 371—376 (1937).
- Dukes, C. E. The classification of cancer of the rectum. *Dis. Colon Rectum* 23: 605—611 (1980).
- Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haußmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich, P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*, 65: 13-24, 1991.
- Heider, K.-H., Hofmann, M., Horst, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S.T. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J. Cell Biol.*, 120: 227—233, 1993.
- Hofmann, M., Rudy, W., Zöller, M., Tölg, C., Ponta, H., Herrlich, P., and Günthert, U. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.*, 51: 5292—5297, 1991.
- Kearney, J.F., Radbruch A., Liesegang B., Rajewski K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* 123: 1548 (1979).
- Koopman, G., Heider, K.-H., Horts, E., Adolf, G. R., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S. T. Activated human lymphocytes and aggressive Non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J. Exp. Med.* 177: 897—904 (1993).
- Sambrook, J., Fritsch E.E., Maniatis I., *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989.
- Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., and Bell, J. I. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 12160—12164, 1992.
- Smith, D.B., Johnson, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31 (1988).
- Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J.M., and Seed, B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell*, 56: 1057—1062, 1989.
- Tölg, C., Hoffmann, M., Herrlich, P., and Ponta, H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids. Res.*, 21: 1225—1229, 1993.

Patentansprüche

- Verfahren zur Diagnose außerhalb des menschlichen Körpers und/oder Analyse von Kolonkarzinomen, dadurch gekennzeichnet, daß dieses Verfahren auf dem Nachweis von einem oder mehreren variablen Exons des Gens CD44 und/oder auf dem Nachweis von einem oder mehreren Epitopen, die von einem oder mehreren variablen Exons des Gens CD44 kodiert werden, beruht.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das variable Exon Exon v6 ist bzw. das Epitop von Exon v6 kodiert wird.
- Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Exon für die Aminosäuresequenz

QATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPREDSHSTTGTA,

oder eine allele Variante oder ein Fragment dieser Sequenz kodiert.

- Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Bestimmung des Tumorstadiums angewendet wird.
- Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit Exon v6 des CD44-Gens hybridisiert.
- Nukleinsäure nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Nukleotidsequenz

TCCAGGCAACTCCTAGTAGTACAACGGAAGAAACAGCTACCCAGAAGGAACAGTGGT
TTGGCAACAGATGGCATGAGGGATATCGCCAAACACCCAGAGAAGACTCCCATTCGA
CAACAGGGACAGCTG

oder eine degenerierte oder allele Variante oder ein Fragment oder einen Gegenstrang dieser Sequenz enthält.

- Verwendung der Nukleinsäure gemäß Ansprüchen 5 bis 6 zur Diagnose und/oder Analyse von Kolonkarzinomen.
- Verwendung der Nukleinsäure gemäß Ansprüchen 5 bis 6 zur Diagnose und/oder Analyse von Metastasen.
- Antikörper gegen variantes CD44, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen ein Epitop gerichtet ist, das in der Aminosäuresequenz von Exon v6,

5

10

10. Antikörper nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.

15

13. Verwendung eines Antikörpers gemäß der Ansprüche 9 bis 11 zur Diagnose und/oder Analyse von Metastasen.

20

16. Mittel zur Verwendung bei der Diagnose und/oder Analyse von Krebserkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Antikörper gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11 enthält.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

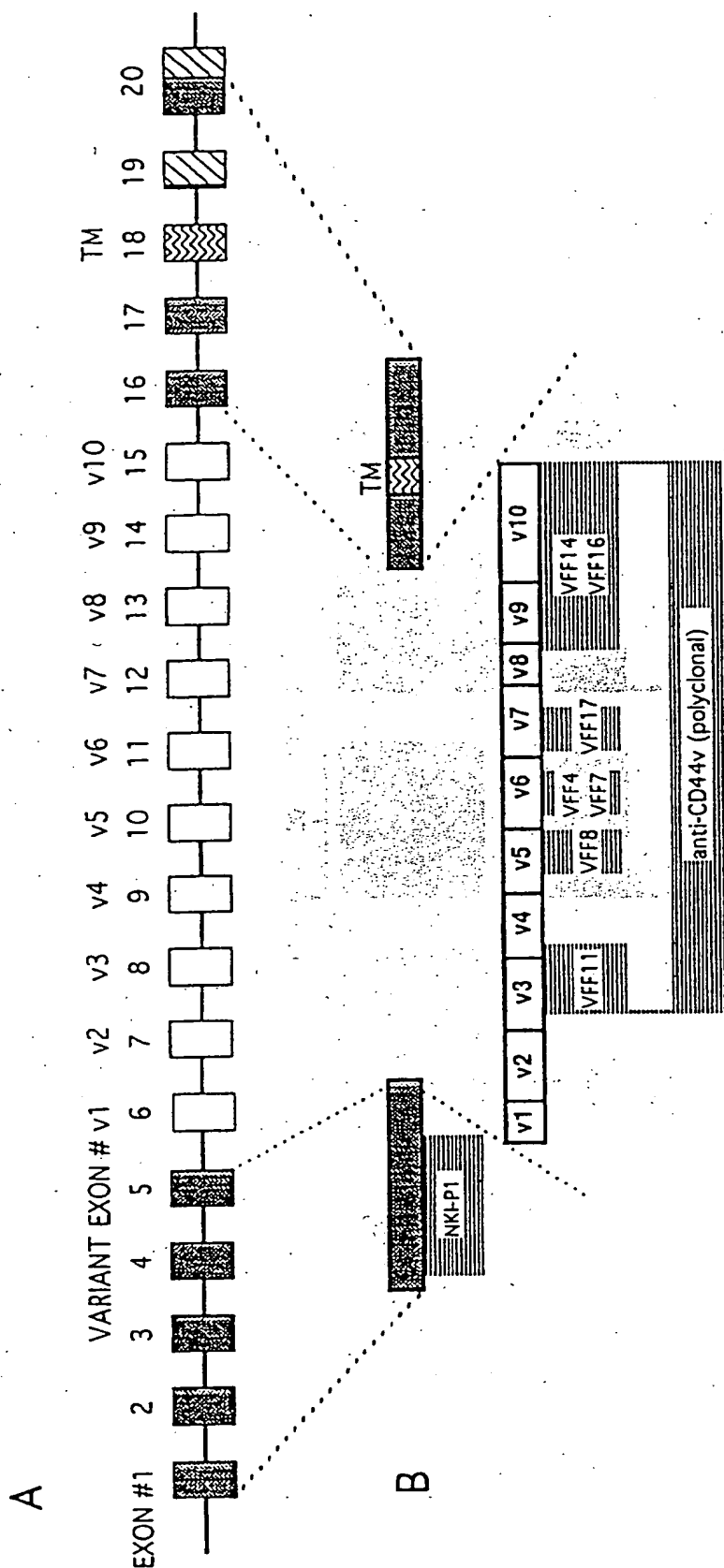


FIG. 1

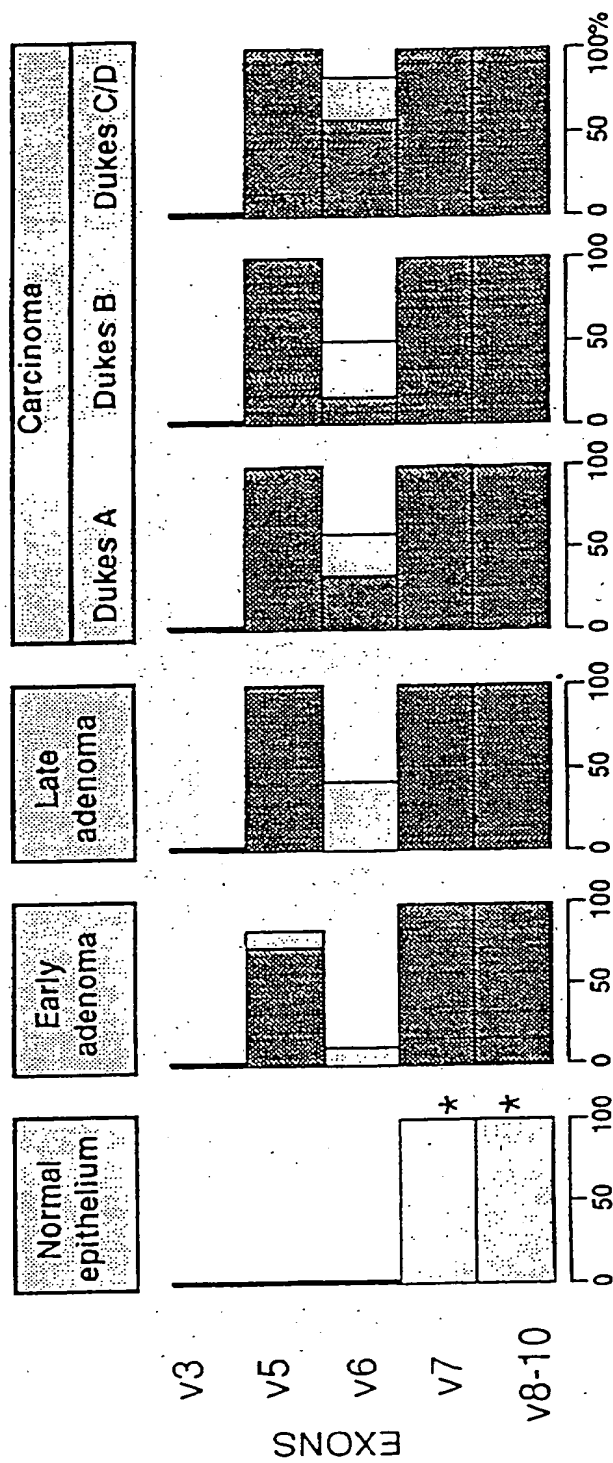


FIG. 2